

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/001407

International filing date: 07 February 2005 (07.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP

Number: 04090037.5

Filing date: 05 February 2004 (05.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 16 March 2005 (16.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

07.02.2005

Europäisches
PatentamtEuropean
Patent OfficeOffice européen
des brevets

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

04090037.5

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk





Anmeldung Nr:
Application no.: 04090037.5
Demande no:

Anmelddetag:
Date of filing: 05.02.04
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Epigenomics AG
Kastanienallee 24
10435 Berlin
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.
If no title is shown please refer to the description.
Si aucun titre n'est indiqué se referer à la description.)

Verwendung von nicht-methylierter DNA als Kontroll- und Kalibrierungsstandard

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)
revendiquée(s)
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/
Classification internationale des brevets:

C12Q1/68

Am Anmelddetag benannte Vertragstaaten/Contracting states designated at date of
filing/Etats contractants désignés lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL
PT RO SE SI SK TR LI



EPO-BERLIN

05-02-2004

Titel

Verwendung von nicht-methylierter DNA als Kontroll- und
Kalibrierungsstandard

05-02-2004

Hintergrund der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von DNA, in der 5-Methylcytosin nicht auftritt. Solche nicht-methylierte DNA ist insbesondere als Kontrolle für eine verlässliche und sensitive Analyse von Cytosinmethylierungen erforderlich.

5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt eine wichtige biologische Rolle, u.a. bei der Transkriptionsregulation, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese (zur Übersicht: Millar et al.: Five not four: History and significance of the fifth base. In: The Epigenome, S. Beck and A. Olek (eds.), Wiley-VCH Verlag Weinheim 2003, S. 3-20). Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichen Interesse. Ein Nachweis der Methylierung ist allerdings schwierig, da Cytosin und 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweisen. Viele der herkömmlichen, auf Hybridisierung beruhenden Nachweisverfahren vermögen daher nicht zwischen Cytosin und Methylcytosin zu unterscheiden. Zudem geht die Methylierungsinformation bei einer PCR-Amplifikation vollständig verloren.

Die herkömmlichen Methoden zur Methylierungsanalyse arbeiten im wesentlichen nach zwei unterschiedlichen Prinzipien. Zum einen werden methylierungsspezifische Restriktionsenzyme benutzt, zum anderen erfolgt eine selektive chemische Umwandlung von nicht-methylierten Cytosinen in Uracil (sog.: Bisulfit-Behandlung, siehe etwa: DE

101 54 317 A1; DE 100 29 915 A1). Die enzymatisch oder chemisch vorbehandelte DNA wird dann meist amplifiziert und kann auf unterschiedliche Weise analysiert werden (zur Übersicht: WO 02/072880 S. 1 ff). Von großem Interesse sind dabei Verfahren, die in der Lage sind, Methylierung sensitiv und quantitativ zu detektieren. Dies gilt aufgrund der wichtigen Rolle der Cytosin-Methylierung in der Krebsentstehung insbesondere in Hinblick auf diagnostische Anwendungen. Die herkömmlichen Verfahren gewährleisten eine sensitive und quantitative Methylierungsanalyse bisher nur beschränkt.

Zur sensitiven Analyse wird die chemisch vorbehandelte DNA üblicherweise mittels eines PCR-Verfahrens amplifiziert. Über die Verwendung methylierungsspezifischer Primer oder Blocker wird dann eine selektive Amplifikation nur der methylierten (bzw. bei umgekehrten Ansatz: unmethylierten) DNA gewährleistet. Der Einsatz methylierungsspezifischer Primer ist als sog. „methylierungssensitive PCR“ bekannt („MSP“; Herman et al.: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Sep 3;93(18):9821-6). Ein vergleichbar sensitives Verfahren ist die sogenannte „Heavy Methyl“-Methode. Dabei wird eine spezifische Amplifizierung nur der ursprünglich methylierten (bzw. unmethylierten) DNA durch Einsatz von methylierungsspezifischen Blocker-Oligomeren erreicht (zur Übersicht: WO 02/072880; Cottrell et al.: A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers. Nucl. Acids. Res. 2004 32: e10). Sowohl MSP wie Heavy Methyl sind auch als quantifizierbare Real-Time-Varianten anwendbar. Diese ermöglichen es, den Methylierungs-

rungsstatus von Positionen direkt im Verlauf der PCR nachzuweisen, ohne dass eine nachfolgende Analyse der Produkte erforderlich wäre („MethyLight“ - WO00/70090; US 6,331,393).

5

Eine verlässliche Quantifizierung des Methylierungsstatus über einen linearen Bereich ist mit den oben beschriebenen Verfahren bisher jedoch nur begrenzt möglich. Hierfür ist erforderlich, dass die Assays sowohl mit vollmethylierter wie auch mit nicht-methylierter DNA kalibriert werden (vgl.: Trinh et al.: DNA methylation analysis by MethyLight technology. Methods. 2001 Dec; 25(4): 456-62). Die Herstellung vollmethylierter DNA ist relativ einfach über die Verwendung der SssI-Methylase möglich. Dieses Enzym überführt im Sequenzkontext CG alle nicht-methylierten Cytosine in 5-Methylcytosin. Problematisch ist allerdings die Herstellung von vollständig nicht-methylierter DNA. Denn ein der SssI-Methylase entsprechendes Enzym, das quantitativ alle Methylgruppen entfernt, steht nicht zur Verfügung. Bisher wird zur Kalibrierung Sperma-DNA verwandt, die über einen geringen Methylierungsgrad verfügt (vgl.: Trinh et al. 2001, a.a.o.). Gleichwohl ist die Sperma-DNA teilweise methyliert und eignet sich daher als verlässlicher Standard nur bedingt. Auch künstlich hergestellte, kurze unmethylierten Sequenzen wie PCR-Amplifikate sind nur begrenzt einsetzbar, etwa für die Analyse einzelner, definierter Positionen. Für Multiplex-Reaktionen können diese Standards nicht verwendet werden, da die Komplexität der Reaktion dann zu hoch wäre. Zudem erfordert die Entwicklung eines jeden neuen Nachweis-Assays die Herstellung eines neuen definierten Standards. Dagegen würde ein unmethylierter

10

15

20

25

30

Standard, der die gesamte genomischen DNA oder einen representativen Teil hiervon abdeckt, eine zuverlässig quantifizierbare Methylierungsanalyse erlauben. Zudem wäre eine standardisierte und damit einfache, kostengünstige und schnelle Entwicklung neuer Nachweisassays möglich. Aufgrund der besonderen biologischen und medizinischen Bedeutung der Cytosin-Methylierung und aufgrund der oben erwähnten Nachteile der zur Zeit verwendeten Standards besteht ein großes technisches Bedürfnis an Methoden, die 10 genomische DNA in vollständig nicht-methylierter Form zur Verfügung stellen. Im folgenden ist ein solches - überraschend einfaches - Verfahren beschrieben.

Erfindungsgemäß werden zur Herstellung nicht-methylierter DNA sogenannte genomweite Amplifikationsverfahren verwendet (WGA - whole genome amplification, zur Übersicht: Hawkins et al.: Whole genome amplification--applications and advances. Curr Opin Biotechnol. 2002 Feb; 13(1): 65-7). In diesen Verfahren wird ein großer Teil der genomischen DNA mittels einer DNA-Polymerase und „Random“- oder degenerierter Primer vervielfältigt. Dabei werden in den Amplifikationen nur nicht-methylierte Cytidintriphosphate angeboten, so dass die Amplifikate vollständig unmethyliert synthetisiert werden. Nach mehreren Amplifikationsrunden tritt die Menge der partiell methylierten Matrizen-DNA im Vergleich zu den neu hergestellten, nicht-methylierten Nukleinsäuren vollständig in den Hintergrund.

30 Bisher sind unterschiedliche WGA-Verfahren beschrieben. Bei der sog. Primer-Extensions-Präamplification (PEP: primer extension preamplification) wird die Amplifikation

mittels einer Taq-Polymerase und einer zufälligen Mischung von Oligonukleotidprimern mit einer Länge von etwa 15 Nukleotiden durchgeführt (Zhang et al.: Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jul 1; 89(13): 5847-51). Bei der DOP-PCR (degenerate oligonucleotide primed polymerase chain reaction) wird dagegen nur ein degenerierter Primer eingesetzt (vgl.: Telenius et al.: Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. Genomics. 1992 Jul; 13(3): 718-25). Ein weiteres WGA-Verfahren ist die sog. Linker-Adaptor-PCR. Dabei wird die DNA zunächst mittels eines Restriktionsenzyms verdaut. Anschließend werden an die Restriktionsfragmente 15 Linker ligiert. In der folgenden Amplifikation werden Primer eingesetzt, die spezifisch an die Linker binden (zur Übersicht: Cheung and Nelson: Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one 20 nanogram of genomic DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Dec 10; 93(25): 14676-9 m.w.N.). Die oben beschriebenen, auf PCR-basierenden WGA-Verfahren haben allerdings mehrere Nachteile. So kann es etwa zur Generierung unspezifischer Amplifikationsartefakte kommen. Zudem erfolgt oft 25 nur eine unvollständige Abdeckung aller Genombereiche. Weiterhin entstehen teilweise nur kurze DNA-Fragmente mit einer Länge von weniger als 1 kB. (vgl.: Dean et al.: Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. Proc Natl Acad Sci U S A. 30 2002 Apr 16; 99(8): 5261-6 m.w.N.). Das zur Zeit schlagkräftigste Verfahren zur genomweiten Amplifikation ist daher die isotherme "Multiple Displacement Amplification"

(MDA, vgl.: Dean et al. 2002 a.a.o.; US Patent 6,124,120). Hierbei wird die genomische DNA mit „Random“-Primern und einer DNA-Polymerase umgesetzt. Es werden dabei Polymerasen eingesetzt, die in der Lage sind, den Nicht-Template-Strang des DNA-Doppelstrangs während der Amplifikation zu verdrängen (etwa eine φ29 Polymerase). Die verdrängten Stränge dienen wiederum als Matrize für die Extension weiterer Primer. Mit diesem Verfahren ist es möglich, aus nur 1-10 Kopien menschlicher genomischer DNA etwa 20-30 µg DNA herzustellen. Dies entspricht einer mehr als 5000-fachen Amplifikation. Die durchschnittliche Produktlänge beträgt dabei mehr als 10 kB, wobei die Amplifikation relativ gleichmäßig über das gesamte Genom erfolgt. Die Reaktion kann direkt aus biologischen Proben erfolgen, etwa aus Blut oder Zellkulturen. Kommerzielle Kits zur MDA sind zur Zeit über zwei Anbieter verfügbar („GenomiPhi“ von Amersham Biosciences, www4.amershambiosciences.com; „Repli-g“ von Molecular Staging, www.molecularstaging.com). Auch bereits amplifizierte DNA ist über diese Anbieter erhältlich. Die mittels MDA hergestellte DNA wird in vielfältigen Anwendungen eingesetzt, etwa im Genotyping von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP), im „Chromosomen-Painting“, in der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismusanalyse, in der Subklonierung und in der DNA-Sequenzierung. Die MDA ist so insbesondere für genetische, forensische und diagnostische Untersuchungen verwendbar (vgl.: Dean et al. 2002, a.a.o.).

30 Die Verwendung von durch WGA-Methoden hergestellten DNA als Standard in Verfahren zum Nachweis von 5-Methylcytosin ist bisher noch nicht bekannt. Die im fol-

genden genauer beschriebenen Anwendungen eröffnen der Methylierungsanalyse daher erstmals Zugang zu genomischer, nicht-methylierter DNA. Aufgrund der besonderen Bedeutung der Cytosinmethylierung und aufgrund der beschriebenen Nachteile des Standes der Technik stellt das Eröffnen dieser vorteilhaften, neuen Technologie einen wichtigen 5 technischen Fortschritt dar.

10

Beschreibung

15

Erfindungsgemäß wird die durch genomweite Amplifizierungsverfahren hergestellter DNA als Standard in der Methylierungsanalyse verwendet. Erfindungsgemäß ist weiterhin ein Verfahren zur Methylierungsanalyse, das dadurch gekennzeichnet ist, dass

- a) eine genomweite Amplifikation durchgeführt wird,
- b) die Amplifikate in der Methylierungsanalyse als Standard verwendet werden.

20

Prinzipiell können erfindungsgemäß alle oben beschriebenen WGA-Verfahren eingesetzt werden. Die Reaktionsbedingungen der PEP, DOP-PCR und Linker-PCR gehören zum Stand der Technik (s.o.). Aufgrund der oben beschriebenen Nachteile der auf PCR basierenden WGA-Verfahren wird erfindungsgemäß bevorzugt eine MDA durchgeführt. Auch die Reaktionsbedingungen für ein MDA-Verfahren sind hinreichend bekannt (vgl.: Dean et al 2002, a.a.o.; US-Patent 6,124120; 6280949; 6642034; US-Anmeldung 20030143536; Produktinformationen zu den oben erwähnten Genomiphi und Repli-g-Kits). Auch andere Variationen der WGA, insbesondere des MDA-Verfahrens, können erfindungsgemäß zur Herstellung nicht-methylierter DNA verwendet werden. So ist es etwa möglich, die DNA zunächst zu fragmentieren und an die Fragmente Linker zu ligieren. Anschließend werden die Fragmente in Concatamere überführt, die dann über eine 25

30

35

MDA amplifiziert werden (multiple strand displacement amplification of concatenated DNA - MDA-CA ; vgl.: US 6,124,120).

5 Erfindungsgemäß bevorzugt wird jedoch eine herkömmliche MDA benutzt. Vorzugsweise werden zwei Sets von Primern verwendet. Jeweils ein Primerset ist komplementär zu einen Strang der zu amplifizierenden DNA. Bei den Primer-sets kann es sich um Random-Primer oder degenerierte Primer handeln. Einzelheiten zur Anzahl, Länge und zur Struktur der Primer sind vielfach beschrieben (vgl.: US 6,124,120). So etwa bekannt, dass Primer verwendet werden können, die am 5'-Ende nicht komplementär zu der Zielsequenz sind. Hiermit wird die Verdrängung der Primer durch 10 die Polymerase erleichtert. Die 5'-Region der Primer kann zudem funktionale Sequenzen, etwa für einen Promotor tragen (vgl.: US 6,124,120). Der optimale Aufbau der Primer hängt von der Art der verwendeten Polymerase ab, insbesondere von ihrer Prozessivität (vgl.: US 6,124,120). Besonders bevorzugt werden Hexamer-Primer benutzt. Verschiedene Polymerasen sind in der MDA-Reaktion einsetzbar. Die Enzyme müssen entweder alleine oder in Kombination mit Hilfsfaktoren (etwa Helikasen) in der Lage sein, 15 während der Replikation den Nicht-Matrizenstrand der zu replizierenden DNA-Doppelhelix zu verdrängen. Dabei werden bevorzugt Polymerasen eingesetzt, die über keine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität verfügen. Alternativ können allerdings auch Primer eingesetzt werden, die am 5'Ende blockiert und daher von den Polymerasen nicht degradierbar sind. Als Polymerase wird besonders bevorzugt die ϕ 29-Polymerase verwendet. Diese verfügt über eine sehr 20 hohe Prozessivität, die es ihr erlaubt, sehr effektiv DNA zu synthetisieren, auch wenn extreme Basenzusammensetzungen, kurze Tandemwiederholungen (short tandem repeats) oder Sekundärstrukturen in der DNA auftreten. In dem US-Patent 6124120 und in der US-Patenanmeldung 2003/0143536 25 30 35

Al sind weitere einsetzbare Polymerasen aufgeführt, etwa Bst, Bca oder Phage M2-DNA-Polymerase. Die für die Amplifikation erforderlichen Reaktionsbedingungen sind von der Auswahl der Polymerasen und der Primer abhängig und ergeben sich ebenfalls aus den oben genannten Referenzen. Es ist u.a. auch bekannt, dass über unterschiedliche Methoden eine Detektion und Quantifizierung der amplifizierten DNA erreicht werden kann, etwa über den Einbau markierter Nukleotide, über Verwendung besonderer Detektionssonden oder über Festphasendetektoren (Vgl.: 6,124,120).

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die kommerziell erhältlichen Kits zur Synthese der nicht-methylierten DNA verwendet. Besonders bevorzugt werden die Kits „GenomiPhi“ (Amersham Biosciences) oder „Replig“ (Molecular Staging) verwendet. Die Amplifikation erfolgt dabei nach Herstellerangaben. Im wesentlichen wird dabei die zu amplifizierenden DNA mit einem Probenpuffer und Random Hexamer Primern versetzt. Die Mischung wird hitzedenaturiert und anschließend gekühlt, so dass es zu einer Bindung der Primer an die DNA kommen kann. Danach werden die verbleibenden Reaktionskomponenten, insbesondere die Desoxynukleosidtriphosphate und die φ29-Polymerase hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wird dann für etwa 30 Stunden bei 30°C inkubiert. Als Ausgangsmaterial kann etwa DNA verwandt werden, die über die kommerziell verfügbaren Aufreinigungsmethoden isoliert wurde. Für zelluläre Proben wie Blutproben oder Primärzellen aus klinischen Proben kann auch eine alkalische Lyse mit nachfolgender Neutralisation ausreichend sein (vgl.: Produktinformation von Amersham zum GenomiPhi-DNA-Amplifikationskit).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird als Standard kommerziell erhältliche, über MDA hergestellte DNA verwendet (s.o.). Dies hat den Vorteil,

dass die DNA aufgrund der standardisierten Herstellungsprozesse von gleichbleibender Konzentration und Qualität ist.

5 Die über die oben beschriebenen Verfahren hergestellte oder käuflich erworbene DNA kann in einer Vielzahl von Methylierungsanalyseverfahren als Standard verwendet werden. Hierzu gehören sowohl Verfahren, die auf dem Einsatz von Restriktionsenzymen beruhen, wie auch Verfahren, die 10 auf einer Bisulfitbehandlung der DNA basieren (vgl.: Fraga and Esteller: DNA Methylation: A Profile of Methods and Applications. *Biotechniques* 33:632-649, September 2002). Bevorzugt wird zunächst eine Bisulfitumwandlung durchgeführt. Die Bisulfitumwandlung ist dem Fachmann in 15 unterschiedlichen Variationen bekannt (siehe etwa: Frommer et al.: A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Mar 1;89(5):1827-31; Olek, A modified and improved method for 20 bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* 1996 Dec 15;24(24):5064-6.; DE 100 29 915; DE 100 29 915). Besonders bevorzugt erfolgt die Bisulfitumwandlung in Gegenwart von denaturierenden Lösemitteln, etwa Dioxan, und eines Radikalfängers (vgl.: DE 100 29 25 915). In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird die DNA nicht chemisch, sondern enzymatisch umgewandelt. Dies ist etwa durch Einsatz von Cytidin-Deaminasen denkbar, die unmethylierte Cytidine schneller umsetzen als methylierte Cytidine. Ein entsprechendes Enzym ist kürzlich 30 identifiziert worden (Bransteitter et al.: Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on

single-stranded DNA but requires the action of RNase.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 1;100(7):4102-7).

Die umgewandelte DNA kann anhand der gängigen molekular-
5 biologischen Verfahren analysiert werden, etwa über Hybi-
disierung oder Sequenzierung. In einer bevorzugten Vari-
ante wird die umgewandelte DNA zunächst amplifiziert.
Hierzu sind dem Fachmann unterschiedliche Verfahren be-
kannt, etwa Ligasekettenreaktionen. Vorzugsweise wird die
10 DNA allerdings über eine Polymerasereaktion amplifiziert.
Hierzu sind verschiedene Ausgestaltungen denkbar, etwa
die Verwendung isothermer Amplifikationsverfahren. Beson-
ders bevorzugt sind allerdings Polymerasekettenreaktionen
15 (PCR). In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungs-
form erfolgt die PCR unter Verwendung von Primern, die
spezifisch nur an Positionen der umgewandelten Sequenz
binden, die vorher entweder methyliert oder (bei umge-
kehrtem Ansatz) unmethyliert waren (MSP, s.o.). In einer
20 anderen ganz besonders bevorzugten Ausführungsform wird
die umgewandelte DNA mit Hilfe von methylierungsspezifi-
scher Blockern analysiert („Heavy-Methyl“-Methode, s.o.).
Die Detektion der PCR-Amplifikate kann über herkömmliche
Verfahren erfolgen, etwa über Methoden der Längenmessung
wie Gelelektrophorese, Kapillargelelektrophorese und
25 Chromatographie (z.B. HPLC). Auch Massenspektrometrie und
Methoden zur Sequenzierung wie die Sanger-Methode, die
Maxam-Gilbert-Methode und Sequencing by Hybridisation
(SBH) können verwendet werden. In einer bevorzugten Aus-
führungsform werden die Amplifikate durch Primer-
30 Extension-Verfahren nachgewiesen oder durch methylier-
ungsspezifische Ligationsverfahren (siehe etwa: Gonzalgo
& Jones: Rapid quantitation of methylation differences at

specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). Nucleic Acids Res. 1997 Jun 15;25(12):2529-31; DE 100 10 282; DE 100 10 280). In einer anderen bevorzugten Ausführungsform werden die Amplifikate mittels Hybridisierung an Oligomer-Arrays analysiert (vgl.: Adorjan et al.: Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis. Nucleic Acids Res. 2002 Mar 1; 30(5): e21). In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform werden die Amplifikate unter Verwendung von PCR-Real-Time-Varianten analysiert (vgl.: Heid et al.: Real time quantitative PCR. Genome Res. 1996 Oct;6(10):986-94, US Patent No. 6,331,393 „Methyl-Light“). Dabei wird die Amplifikation in Gegenwart eines methylierungsspezifischen, fluoreszenzmarkierten Reporteroligonukleotid durchgeführt. Das Reporteroligonukleotid bindet dann bevorzugt an die zu untersuchende DNA und zeigt deren Amplifikation durch Zunahme oder Abnahme der Fluoreszenz an. Dabei ist es besonders vorteilhaft, wenn die Fluoreszenzveränderung direkt zur Analyse benutzt wird und aus dem Fluoreszenzsignal auf einen Methylierungszustand geschlossen wird. Eine besonders bevorzugte Variante ist dabei das „Taqman“-Verfahren. In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform wird ein zusätzliches fluoreszenzmarkiertes Oligomer verwendet, das in unmittelbarer Nähe zu dem ersten Reporteroligonukleotid hybridisiert und sich diese Hybridisierung mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer nachweisen lässt („Lightcycler“-Verfahren).

30 Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist es, mehrere Fragmente gleichzeitig mittels einer Multiplex-

PCR zu amplifizieren. Bei deren Design muss darauf geachtet werden, daß nicht nur die Primer, sondern auch die weiteren eingesetzten Oligonukleotide nicht zueinander komplementär sein dürfen, so daß eine hochgradige Multiplexierung in diesem Fall schwieriger ist als in üblich. Jedoch hat man bei der chemisch vorbehandelten DNA den Vorteil, daß aufgrund des unterschiedlichen G- und C-Gehaltes der beiden DNA-Stränge ein Forward-Primer niemals auch als Reverse-Primer fungieren kann, was die Multiplexierung wiederum erleichtert und den oben beschriebenen Nachteil im wesentlichen ausgleicht. Die Detektion der Amplifikate ist wiederum über unterschiedliche Verfahren möglich. Denkbar ist dabei etwa die Verwendung von Real-Time-Varianten. Für Amplifikationen von mehr als vier Genen empfiehlt es sich aber, die Amplifikate auf andere Weise zu detektieren. Bevorzugt ist dabei eine Analyse über Arrays (s.o.).

Eine aktuelle Übersicht über weitere mögliche Methoden zur Methylierungsanalyse findet sich in: Fraga and Esteller 2002, a.a.o.).

In den unterschiedlichen Methoden zur Methylierungsanalyse kann die MDA-DNA auf unterschiedliche Weise als Standard eingesetzt werden. Unter Standard ist dabei zum einen jegliche Art der Negativkontrolle oder Positivkontrolle im Falle des Nachweises von nicht-methylierter DNA zu verstehen. Dies ist insbesondere bei Technologien der Fall, die kleinste Mengen methylierte DNA in einem großen Hintergrund von nicht-methylierter DNA nachweisen und umgekehrt (sensitive detection). Hier dient MDA-DNA während der Assay-Entwicklung als Kontrolle der Spezifität des Assays für methylierte DNA und in der Anwendung des As-

5 says als Negativkontrolle. Erfindungsgemäß bevorzugt ist aber auch, ein Gemisch aus nicht-methylierter DNA und methylierter DNA zu verwenden. Besonders bevorzugt ist es, unterschiedliche Gemische aus nicht-methylierter und me-
10 thylierter DNA zu verwenden. Hiermit können dann Kalib-
rierungskurven erstellt werden. Um methylierte DNA zu synthetisieren, wird dabei bevorzugt ebenfalls eine über MDA hergestellte DNA benutzt. Die DNA wird dann mittels einer SssI-Methylase methyliert (s.o.). Dabei wird die nicht-methylierte DNA ebenfalls mit allen Reaktionskompo-
15 nenten des Methylierungsansatzes bis auf die Methylase umgesetzt. So ist sichergestellt, dass die DNA-
Konzentration in beiden Ansätzen identisch ist, und in beiden Ansätzen die gleichen Reaktionskomponenten anwe-
20 send sind. Anschließend werden nicht-methylierte und methylierte DNA in unterschiedlichen Verhältnissen ge-
mischt, etwa im Verhältnis 4:0 für 0%, 3:1 für 25%, 2:2 für 50%, 1:3 für 75%, 0:4 für 100%. Für die Entwicklung von Assays für die sensitive Detektion kann es bevorzugt sein, Mischungen mit sehr geringen Konzentrationen an methylierter DNA (etwa 1: 2000-1:10000) herzustellen.

25 Indem der Quotient der Signale, die für den methylierten Zustand detektiert werden, und der Signale, die für den unmethylierten Zustand detektiert werden, gebildet wird, erhält man die gemessene Methylierungsrate. Trägt man diese gegen die theoretischen Methylierungsraten (entspre-
30 chend dem Anteil methylierter DNA in den definierten Mi-
schungen) auf und ermittelt die Regression, die durch die Messpunkte geht, erhält man eine Kalibrierungskurve. An-
hand dieser Kalibrierungskurve lässt sich über die gemes-
sene Methylierungsrate der Methylierungsgrad der unbekannten Proben bestimmen.

Die oben beschriebenen Kontrollen oder Standards lassen sich bei allen Methoden der quantitativen Methylierungsanalyse verwenden: u.a. bei MS-SnuPE, bei Hybridisierung auf Microarrays, Hybridisierungsassays in Lösung, direkte Bisulfit-Sequenzierung, bei Real Time PCR (z.B. Heavy Methyl, MSP. vgl. zu den PMR-Werten: Eads et al., CANCER RESEARCH 61, 3410-3418, April 15, 2001),

Eine besonders bevorzugte Verwendung der durch WGA-Verfahren hergestellten DNA und des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt in der Diagnose von Krebserkrankungen oder anderen mit einer Veränderung des Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten. Hierzu gehören u.a. CNS-Fehlfunktionen, Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion. Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich außerdem zur Vorhersage von unerwünschten Arzneimittelwirkungen und zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

Erfindungsgemäß ist weiterhin ein Kit, der aus Reagenzien zur Durchführung eines WGA-Verfahrens oder aus bereits über ein WGA-Verfahren amplifizierter DNA sowie aus Reagenzien zur Durchführung einer Bisulfitumwandlung besteht, und optional auch eine Polymerase, Primer und/oder Sonden für eine Amplifikation und Detektion enthält.

Erfindungsgemäß ist auch vollständig methylierte DNA, die über ein WGA-Verfahren hergestellt und anschließend mittels eines Enzyms, bevorzugt der SssI Methylase, methyliert wurde. Erfindungsgemäß ist schließlich auch ein Gemisch aus methylierter und nicht-methylierter, über ein genomweites Amplifikationsverfahren hergestellter DNA. Ein solches Gemisch kann insbesondere als Standard in der Methylierungsanalyse verwendet werden. Die Herstellung des Gemisches kann dabei wie oben beschrieben erfolgen. Bevorzugt sind Gemische mit einem Anteil von 5 bis 95% methylierter DNA, besonders bevorzugt Gemische mit einem Anteil methylierter DNA von 10 bis 80%, ganz besonders bevorzugt Gemische mit einem Anteil methylierter DNA von 25 bis 75%.

Beispiele

25 Verwendung von MDA-DNA für Kalibrierungen

Der Methylierungsgrad einer DNA aus abdominalem Fettgewebe soll mittels Oligonukleotid-Arrays und zum Vergleich mittels des Ms-SnuPE-Verfahrens bestimmt werden. Hierzu wird die DNA aus der biologischen Probe mit Hilfe des QIAamp Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben extrahiert. Zur Aufnahme einer Kalibrierungskurve werden unterschiedliche Mischungen methylierter und nicht-methylierter DNA hergestellt (0%, 25%, 50%; 75%, 100%). Die nicht-methylierte DNA wurde

über Molecular Staging bezogen, wo sie über eine MDA-Reaktion aus humaner genomischer DNA aus ganzem Blut hergestellt worden war. Bei einer MDA-Reaktion werden alle Methylierungssignale gelöscht (s.o.). Die 5 vollständig methylierte DNA wird aus der MDA-DNA mittels einer SssI-Methylase (New England Biolabs) hergestellt. Die Synthese erfolgt nach Herstellerangaben. Die nicht-methylierte DNA wird dabei mit allen Reagenzien bis auf die SssI-Methylase umgesetzt. So ist sichergestellt, dass 10 die DNA-Konzentration in beiden Ansätzen identisch ist, und in beiden Ansätzen die gleichen Reaktionskomponenten anwesend sind. Anschließend werden die nicht-methylierte und methylierte DNA in folgenden Verhältnissen gemischt: 4:0 für 0%, 3:1 für 25%, 2:2 für 50%, 1:3 für 75%, 0:4 15 für 100%. Die DNA wird anschließend in Gegenwart von Dioxan als denaturierendem Lösemittel Bisulfit-umgewandelt (vgl.: DE 10029 915 A1; deutsche Anmeldung: AZ: 10347396.3). Anschließend werden die DNA-Gemische und die biologische DNA-Probe in einer Multiplex-PCR eingesetzt. 20 Dabei werden jeweils 8 Fragmente amplifiziert. Als Primer werden die in Tabelle 1 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Die Amplifikationen werden mittels des QIAGEN HotStarTaq-Kits im wesentlichen nach Herstellerangaben und mit dem folgenden Temperaturprofil durchgeführt: 25 95°C: 15 min; 45 mal: (95°C: 15sec; 55°C: 30sec; 72°C: 60 sec); 72°C : 10 min. Die Multiplex-PCR-Produkte werden anschließend an ein Oligomer-Array hybridisiert. Die Sonden-Oligonukleotide sind in Tabelle 2 angegeben. Die 30 Hybridisierung und die Signalberechnung erfolgen dabei wie bei Adorjan et al., 2002 (a.a.o.) beschrieben. Für jede Probe und jeden Kalibierungsmix werden acht Hybridisierungen durchgeführt. Für die Erstellung von

Kalibrierungskurven für eine CpG-Position wird die gemessene Methylierungsrate gegen die theoretische Methylierungsrate aufgetragen. Die gemessene Methylierungsrate ergibt sich aus der Signalintensität einer Oligonukleotidsonde, die für den methylierten Status spezifisch ist, dividiert durch die Gesamtintensität dieser Sonde + einer dazu passenden (also die gleiche CpG-Position abdeckenden) Sonde, die spezifisch ist für den nicht-methylierten Status. Der theoretische Methylierungsstatus entspricht den Methylierungsniveaus der verwendeten definierten Mischungen. Oligonukleotidsonden-Paare, die für Kalibrierungszwecke geeignet sind, weisen monoton steigende Kalibrierungskurven auf. Für die Ms-SnuPE-Reaktion werden die Proben mit den oben aufgeführten Primern in einzelnen PCR-Reaktionen amplifiziert. Die Reaktionsbedingungen sind die gleichen wie für die Multiplex-PCR (s.o.). In der Extensionsreaktion werden als Primer-Bindungsstellen Positionen verwendet, die direkt flankierend zu CpG-Positionen liegen, die denen der Oligonukleotid-Mikroarrays entsprechen. Der Ms-SnuPE-Assay wird entsprechend den Herstellerangaben des MegaBace-SNuPE-Kits durchgeführt. Für die beiden möglichen Varianten des einzubauenden Nucleotides werden mit unterschiedlichen Farbstoffen markierte ddNTPs verwendet. Für jeden SNuPE-Assay werden vier Messungen parallel durchgeführt. Die von der SNP-Profile-Software (Amersham) ermittelten Signalintensitäten der beiden verwendeten Farbstoffe werden entsprechend der oben für den Chip angegebenen Gleichung ($I_{meth+}/(I_{meth-} + I_{meth+})$) verwendet, um die gemessene Methylierungsrate zu ermitteln. Durch das Auftragen dieser Werte gegen die

theoretische Methylierungsrate erhält man wiederum eine Kalibrierungskurve, die monoton steigend sein sollte. Die so erzeugten monoton steigenden Kalibrierungskurven werden verwendet, um aus der gemessenen Methylierungsrate von Proben-DNA die tatsächliche Methylierung zu ermitteln. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 dargestellt. Die y-Achse zeigt den Prozentsatz an Methylierung, die x-Achse die Hybridisierung an verschiedene Oligonukleotide bzw. verschiedene SNuPE-Assays. Die mit den beiden Methoden ermittelten und an entsprechenden Kalibrierungskurven korrigierten Methylierungsraten in Proben-DNA stimmt für die gezeigten CpG-Positionen gut überein. Diese Daten zeigen, dass die über MDA-hergestellte nicht-methylierte DNA bzw. entsprechende Gemische mit methylierter DNA sehr gut als Standard in der Methylierungsanalyse verwendet werden kann.

Tabelle 1: Primer für die Multiplex-Amplifikation

Gen Name	RefSeq-ID	Primer Orientierung	Sequenz
ERS1	NM_000125	&forward	AGGAGGGGAAATTAAATAGA
	NM_002920	reverse	ACAATAAAACCATCCCAAATAC
AR	NM_000044	forward	GTTAGTAGTAGTAGTAAGAGA
		reverse	ACCCCTAAATAATTATCCT
CDKN2a	NM_000077	forward	GGGGTTGGTTGGTTATTAGA
		reverse	AACCCTCTACCCACCTAAAT
CDKN2B	NM_004936	forward	GGTTGGTTGAAGGAATAGAAAT
		reverse	CCCACTAAACATAACCCTTATTG
GSTP1	NM_000852	forward	ATTTGGGAAAGAGGGAAAG
		reverse	TAAAAACTCTAAACCCCATCC
TP73	NM_005427	forward	AGTAAATAGTGGGTGAGTTATGAA

		reverse	GAAAAACCTCTAAAAACTACTCTC C
MLH1	NM_000249	forward	TAAGGGAGAGGAGGAGTTT
		reverse	ACCAATTCTCAATCATCTCTTT
MGMT	NM_002412	forward	AAGGTTTAGGAAAGAGTGT
		reverse	ACCTTTCTATCACAAAAATAA

Tabelle 2: Oligonukleotidsonden

Name des Oligonukleotids	Sequenz
Oligonukleotidsonden für ERS1	
41:204A209	ATTTAGTAGCGACGATAAGT
41:204A204	GTCAGCGACGATAAGTAAAGT
41:204A217	TTAGTAGCGACGATAAGTAAA
41:204A2212	TTTATTTAGTAGCGACGATAAG
41:204B237	TTAGTAGTGATGATAAGTAAAGT
41:204B2413	TTTTATTTAGTAGTGATGATAAGT
41:204B2512	TTTATTTAGTAGTGATGATAAGTAA
41:204B2511	TTATTTAGTAGTGATGATAAGTAAA
41:248A195	GGGATCGTTTAAATCGAG
41:248A204	GGATCGTTTAAATCGAGTT
41:248A206	TGGGATCGTTTAAATCGAG
41:248A213	GATCGTTTAAATCGAGTTGT
41:248B216	TGGGATTGTTTAAATTGAGT
41:248B223	GATTGTTTAAATTGAGTTGTG
41:248B224	GGATTGTTTAAATTGAGTTGT
41:248B228	TTTGGGATTGTTTAAATTGAG
41:607A183	GTTCGCGGTTACGGATTA
41:607A193	GTTCGCGGTTACGGATTAT
41:607A194	TGTTCGCGGTTACGGATTA

Name des Oligonukleotids	Sequenz
41:608A203	GTTCGCGGTTACGGATTATG
41:607B213	GTTTGTGGTTATGGATTATGA
41:607B219	TATTTGTTGTGGTTATGGAA
41:607B215	TTGTTTGTGGTTATGGATTAT
41:607B227	TTTTGTTTGTGGTTATGGATTA
41:451A193	TATCGGATTCGTAGGTTTT
41:451A204	TTATCGGATTCGTAGGTTTT
41:451A206	TTTTATCGGATTCGTAGGTT
41:451A207	TTTTTATCGGATTCGTAGGTT
41:451B218	GGTTTTATTGGATTTGTAGGT
41:451B226	TTTTATTGGATTTGTAGGTTTT
41:451B227	TTTTTATTGGATTTGTAGGTTT
41:451B237	TTTTTATTGGATTTGTAGGTTTT
Oligonukleotidsonden für AR	
87:971A188	AGTATTTCGGACGAGGA
87:971A183	TTTCGGACGAGGATGATT
87:971A196	TATTTCGGACGAGGATGA
87:971A1910	TTAGTATTTTCGGACGAGG
87:971B218	AGTATTTTGGATGAGGATGA
87:971B2112	TGTTAGTATTTTGAGGATGAGG
87:971B213	TTTGGATGAGGATGATTTAG
87:971B217	GTATTTTGGATGAGGATGAT
87:1137°164	GTAGCGGGAGAGCGAG
87:1137°175	AGTAGCGGGAGAGCGAG
87:1137°186	TAGTAGCGGGAGAGCGAG
87:1137B183	TAGTGGGAGAGTGAGGGA
87:1137B185	AGTAGTGGGAGAGTGAGG
87:1137B197	GTAGTAGTGGGAGAGTGAG
87:1137B174	GTAGTGGGAGAGTGAGG

Name des Oligonukleotids	Sequenz
87:869A195	ATAGTCGTAGTCGGTTTTG
87:869A208	TTTATAGTCGTAGTCGGTT
87:869A219	TTTTATAGTCGTAGTCGGTT
87:869A2111	ATTTTATAGTCGTAGTCGGT
87:869B193	AGTTGTAGTTGGTTTGGA
87:869B2212	AATTTTATAGTTGTAGTTGGT
87:869B2313	TAATTTTATAGTTGTAGTTGGT
87:869B2414	GTAATTTTATAGTTGTAGTTGGT
87:814A228	AAGTTTATCGTAGAGGTTTAT
87:814A2212	TTTAAGTTTATCGTAGAGGTT
87:814A2310	TTAAGTTTATCGTAGAGGTTTA
87:814A238	AAGTTTATCGTAGAGGTTTATA
87:814B228	AAGTTTATTGTAGAGGTTTAT
87:814B2210	TTAAGTTTATTGTAGAGGTTT
87:814B2212	TTTAAGTTTATTGTAGAGGTT
87:814B2211	TTTAAGTTTATTGTAGAGGTT
Oligonukleotidsonden für CDKN2A	
2035:2147A173	GGCGTGTGTTAACGTA
2035:2147A183	GGCGTGTGTTAACGTAT
2035:2147B195	GGGGGTGTTGTTAACGTA
2035:2147B194	GGGGGTGTTGTTAACGTA
2035:2157A217	TGTTAACGTATCGAACAGTT
2035:2157A227	TGTTAACGTATCGAACAGTT
2035:2157A228	TTGTTAACGTATCGAACAGTT
2035:2157A238	TTGTTAACGTATCGAACAGTT
2035:2157B229	GTTGTTAACGTATTGAATAGT
2035:2157B239	GTTGTTAACGTATTGAATAGT
2035:2157B249	GTTGTTAACGTATTGAATAGT
2035:2183A176	GGAGGTGATTAGGTG

Name des Oligonukleotids	Sequenz
2035:2183A186	GGAGGGTCGATTAGGTGG
2035:2183B186	GGAGGTTGATTTAGGTGG
2035:2172A183	TTACGGTCGGAGGTCGAT
2035:2172A165	AGTTACGGTCGGAGGT
2035:2172A176	TAGTTACGGTCGGAGGT
2035:2172A188	AATAGTTACGGTCGGAGG
2035:2172B198	AATAGTTATGGTTGGAGGT
2035:2172B209	GAATAGTTATGGTTGGAGGT
2035:2172B194	GTTATGGTTGGAGGTTGAT
2035:2172B203	TTATGGTTGGAGGTTGATTT
Oligonukleotidsonden für CDKN2B	
2036:2279A185	GT'TTACGGTTAACGGTGG
2036:2279A183	TTACGGTTAACGGTGGAT
2036:2279A197	AAGTTTACGGTTAACGGTG
2036:2279A209	TTAAGTTTACGGTTAACGGT
2036:2279B206	AGTTTATGGTTAATGGTGGAA
2036:2279B216	AGTTTATGGTTAATGGTGGAT
2036:2279B223	TTATGGTTAATGGTGGATTATT
2036:2279B2210	GT'TAAGTTATGGTTAACGGTG
2036:2330A156	GGAATGCGCGAGGAG
2036:2330A165	GAATGCGCGAGGAGAA
2036:2330A175	GAATGCGCGAGGAGAAAT
2036:2330A184	AATGCGCGAGGAGAAATAA
2036:2330B186	GGAATGTGTGAGGAGAAAT
2036:2330B196	GGAATGTGTGAGGAGAAATA
2036:2330B205	GAATGTGTGAGGAGAAATAAG
2036:2329B206	GGAATGTGTGAGGAGAAATAA
2036:2234A168	AGAGAGTGCCTCGGAG
2036:2234A167	GAGAGTGCCTCGGAGT

Name des Oligonukleotids	Sequenz
2036:2234A166	AGAGTGCCTCGGAGTA
2036:2234A176	AGAGTGCCTCGGAGTAG
2036:2234B178	AGAGAGTGTGTTGGAGT
2036:2234B188	AGAGAGTGTGTTGGAGTA
2036:2234B187	GAGAGTGTGTTGGAGTAG
2036:2234B198	AGAGAGTGTGTTGGAGTAG
2036:2268A193	TGTCGTTAACGTTACGGTT
2036:2268A194	GTGTCGTTAACGTTACGGT
2036:2268A205	AGTGTGTTAACGTTACGGT
2036:2268A203	TGTCGTTAACGTTACGGTTA
2036:2268B215	AGTGTGTTAACGTTATGGTT
2036:2268B216	GAGTGTGTTAACGTTATGGT
2036:2268B224	GTGTTGTTAACGTTATGGTTAA
2036:2268B225	AGTGTGTTAACGTTATGGTTA
Oligonukleotidsonden für MGMT	
2153:597A188	GGATTATTGGGTACGTG
2153:597A184	TATTGGGTACGTGGTAG
2153:597A186	ATTATTGGGTACGTGGT
2153:597A196	ATTATTGGGTACGTGGTA
2153:597B193	ATTTGGGTATGTGGTAGGT
2153:597B205	TTATTTGGGTATGTGGTAGG
2153:597B204	TATTTGGGTATGTGGTAGGT
2153:597B2212	TTTAGGATTATTTGGGTATGTG
2153:621A174	TGTACGTTCGCGGATTAA
2153:621A183	GTACGTTCGCGGATTATT
2153:621A185	TTGTACGTTCGCGGATTAA
2153:621A184	TGTACGTTCGCGGATTAT
2153:621B217	GTTTGTATGTTGTGGATTAT
2153:621B224	TGTATGTTGTGGATTATTTT

Name Oligonukleotids	des Sequenz
2153:621B223	GTATGTTGTGGATTATTTTG
2153:621B225	TTGTATGTTGTGGATTATTT
2153:394A197	TTTGACGGTATCGTTA
2153:394A206	TTTGGACGGTATCGTTATT
2153:394A208	TTTTGGACGGTATCGTTA
2153:394A213	GGACGGTATCGTTATTATAG
2153:394B2111	TAGTTTTGGATGGTATTGTT
2153:394B229	GTTTTGGATGGTATTGTTATT
2153:394B234	TGGATGGTATTGTTATTAGG
2153:394B237	TTTTGGATGGTATTGTTATT
2153:530A173	TTTCGAGTAGGATCGGG
2153:530A184	TTTCGAGTAGGATCGGG
2153:530A183	TTTCGAGTAGGATCGGGA
2153:530A193	TTTCGAGTAGGATCGGAT
2153:530B194	GTTTGAGTAGGATTGGGA
2153:530B193	TTTTGAGTAGGATTGGGAT
2153:530B203	TTTGAGTAGGATTGGGATT
2153:530B204	GTTTGAGTAGGATTGGGAT
Oligonukleotidsonden für MLH1	
2157:1753A176	GAAGAGCGGATAGCGAT
2157:1753A185	AAGAGCGGATAGCGATTT
2157:1753A184	AGAGCGGATAGCGATT
2157:1753A193	GAGCGGATAGCGATT
2157:1753B198	AGGAAGAGTGGATAGTGAT
2157:1753B2110	ATAGGAAGAGTGGATAGTGAT
2157:1753B214	AGAGTGGATAGTGATT
2157:1753B226	GAAGAGTGGATAGTGATT
2157:2026A186	AAATGTCGTTCGTGGTAG
2157:2026A197	AAAATGTCGTTCGTGGTAG

Name des Oligonukleotids	Sequenz
2157:2026A1910	GTTAAAATGTCGTTCGTGG
2157:2026A209	TTAAAATGTCGTTCGTGGTA
2157:2026B195	AATGTTGTTGTGGTAGGG
2157:2026B207	AAAATGTTGTTGTGGTAGG
2157:2026B218	TAAAATGTTGTTGTGGTAGG
2157:2026B2110	GTTAAAATGTTGTTGTGGTA
2157:1770A186	TTTTAACGCGTAAGCGTA
2157:1770A194	TTAACGCGTAAGCGTATAT
2157:1770A195	TTTAACGCGTAAGCGTATA
2157:1770A203	TAACGCGTAAGCGTATATT
2157:1770B239	GATTTTTAATGTGTAAGTGTATA
2157:1770B234	TTAATGTGTAAGTGTATATT
2157:1770B249	GATTTTTAATGTGTAAGTGTATAT
2157:1770B259	GATTTTTAATGTGTAAGTGTATATT
2157:1939A173	GAACGTGAGTACGAGGT
2157:1939A183	GAACGTGAGTACGAGGT
2157:1939A185	AAGAACGTGAGTACGAGG
2157:1939A186	GAAGAACGTGAGTACGAG
2157:1939B207	GGAAGAACGTGAGTACGAGG
2157:1939B208	AGGAAGAACGTGAGTACGAG
2157:1939B216	GAAGAACGTGAGTACGAGGT
2157:1939B213	GAATGTGAGTACGAGGTATTG
Oligonukleotidsonden für TP73	
2322:750A174	GATTCGTTGCGGTTAGA
2322:750A184	GATTCGTTGCGGTTAGAG
2322:750A183	ATTCGTTGCGGTTAGAGA
2322:750A185	GGATTCGTTGCGGTTAGA
2322:750B205	GGATTTGTTGTGGTTAGAGA
2322:750B213	ATTTGTTGTGGTTAGAGAATT

Name des Oligonukleotids	Sequenz
2322:750B214	GATTTGTTGTGGTTAGAGAAT
2322:750B223	ATTTGTTGTGGTTAGAGAATT
2322:1082A164	GGTGC CGCGTAGAGAAT
2322:1082A166	TTGGTGC CGCGTAGAGA
2322:1082A165	TGGTGC CGCGTAGAGAA
2322:1082A174	GGTGC CGCGTAGAGAATA
2322:1082B1810	AGGTTTGGTGTGTAGAGA
2322:1082B195	TGGTGTGTGTAGAGAATAA
2322:1082B207	TTTGGTGTGTGTAGAGAATA
2322:1082B217	TTTGGTGTGTGTAGAGAATAA
2322:858A186	GGATATCGGTT CGGAGTT
2322:858A189	AGAGGATATCGGTT CGGA
2322:858A195	GATATCGGTT CGGAGTTAG
2322:858A193	TATCGGTT CGGAGTTAGAT
2322:858B2011	GTAGAGGATATTGGTTGGAGTT
2322:858B208	GAGGATATTGGTTGGAGTT
2322:858B224	ATATTGGTTGGAGTTAGATTA
2322:858B235	GATATTGGTTGGAGTTAGATTA
2322:1135A204	ATATCGAACGGGATTAGAG
2322:1135A2112	TTTTTTAAATATCGAACGGGA
2322:1135A228	TTAAATATCGAACGGGATTAG
2322:1135A229	TTTAAATATCGAACGGGATTAA
2322:1135B224	ATATTGAATGGGATTAGAGTT
2322:1135B237	TAAATATTGAATGGGATTAGAG
2322:1135B248	TTAAATATTGAATGGGATTAGAG
2322:1135B2413	TTTTTTAAATATTGAATGGGATT
Oligonukleotidsonden für GSTP1	
2111:1900A157	GGGAGTT CGCGGGAT
2111:1900A166	GGAGTT CGCGGGATT

Name des Oligonukleotids	Sequenz
2111:1900A175	GAGTCGCGGGATTTTT
2111:1900A185	GAGTCGCGGGATTTTTT
2111:1900B177	GGGAGTTTGTGGGATTT
2111:1900B187	GGGAGTTTGTGGGATTTT
2111:1900B196	GGAGTTTGTGGGATTTTT
2111:1900B206	GGAGTTTGTGGGATTTTTA
2111:2007A196	GAGTTTCGTCGTCTAGTT
2111:2007B198	TGGAGTTTGTGTTGTTGAG
2111:2007B219	TTGGAGTTTGTGTTGTTGAGT
2111:2126A207	GGTTTTCGTTTATTCGAG
2111:2126A216	GTTCGTTTATTCGAGAT
2111:2126A218	AGGTTTTCGTTTATTCGAG
2111:2126A226	GTTCGTTTATTCGAGATT
2111:2126B217	GGTTTTTGTGTTATTTGAGA
2111:2126B227	GGTTTTTGTGTTATTTGAGAT
2111:2126B228	AGGTTTTTGTGTTATTTGAGA
2111:2126B2310	GTTAGGTTTTGTGTTATTTGAG
2111:2142A153	ATTCGGGACGGGGGT
2111:2142A154	GATTCGGGACGGGGG
2111:2142A155	AGATTCGGGACGGGG
2111:2142A156	GAGATTGGGACGGG
2111:2142B174	GATTTGGGATGGGGTT
2111:2142B175	AGATTTGGGATGGGGGT
2111:2142B176	GAGATTTGGGATGGGGG
2111:2142B184	GATTTGGGATGGGGGTT
Oligonukleotidsonden für CDH13 C	
2383:137A1810	ATGTTATTTCGCGGGGT
2383:137B1910	ATGTTATTTGTGGGGTT
2383:137B2011	GATGTTATTTGTGGGGTT

Name des Oligonukleotids	Sequenz
2383:153A174	TTTCGCGAGGTGTTA
2383:153A184	TTTCGCGAGGTGTTAT
2383:153A185	TTTTCGCGAGGTGTTA
2383:153A195	TTTTTCGCGAGGTGTTAT
2383:153B206	GTTTTTGTGAGGTGTTAT
2383:153B215	TTTTTTGTGAGGTGTTATTT
2383:153B216	GTTTTTGTGAGGTGTTATT
2383:153B226	GTTTTTGTGAGGTGTTATTT
2383:187A173	AAACGAGGGAGCGTTAG
2383:187A174	AAAACGAGGGAGCGTTA
2383:187A175	TAAAACGAGGGAGCGTT
2383:187A185	TAAAACGAGGGAGCGTTA
2383:187B183	AAATGAGGGAGTGTAGG
2383:187B193	AAATGAGGGAGTGTAGGA
2383:187B194	AAAATGAGGGAGTGTAGG
2383:187B197	TGTAAAATGAGGGAGTGT
2383:22°203	GGTCGTTAGTTTCGTGTA
2383:22B203	GGTTGTTAGTTTTGTGTA
2383:22B213	GGTTGTTAGTTTTGTGTA
2383:22B214	TGGTTGTTAGTTTTGTGTA
2383:22B223	GGTTGTTAGTTTTGTGTAAT

05-02-2004

Patentansprüche

1. Verfahren zur Methylierungsanalyse, dadurch gekenn-
5 zeichnet, dass

- c) eine genomweite Amplifikation durchgeführt wird,
- d) die Amplifikate als Standard in der Methylierungs-
analyse verwendet werden

10 2. Verwendung von durch genomweite Amplifizierungsverfah-
ren hergestellter DNA als Standard in der Methylierungs-
analyse.

15 3. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, da-
durch gekennzeichnet, dass als Amplifikationverfahren
PEP, DOP-PCR oder Linker-PCR durchgeführt werden.

20 4. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, da-
durch gekennzeichnet, dass als Amplifikationsverfahren
eine Multiple Displacement Amplification" (MDA) durchge-
führt wird.

25 5. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 4, dadurch ge-
kennzeichnet, dass in der MDA eine φ29-Polymerase einge-
setzt wird.

30 6. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 4, dadurch ge-
kennzeichnet, dass die MDA mittels eines kommerziell er-
hältlichen Kits erfolgt.

7. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 6, dadurch ge-
kennzeichnet, dass als Kit „GenomiPhi“ (Amersham Bios-
ciences) oder „Repli-g“ (Molecular Staging) verwendet
wird.

8. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, das als Standard kommerziell erhältliche, über MDA hergestellte DNA verwendet wird.
- 5 9. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, dass die Methylierungsanalyse über Restriktionsenzyme erfolgt.
- 10 10. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, dass die Methylierungsanalyse über methylierungsspezifische Ligationsverfahren, MSP, Heavy Methyl oder Methyl-Light erfolgt.
- 15 11. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, dass die Methylierungsanalyse über Primer-Extension erfolgt.
- 20 12. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, dass die Methylierungsanalyse über eine Amplifikation und eine Hybridisierung der Amplifikate an Oligomer-Arrays erfolgt.
- 25 13. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, dass die Methylierungsanalyse mittels einer Multiplex-PCR erfolgt.
- 30 14. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-13, dadurch gekennzeichnet, dass als Standard eine Mischung aus methylierter und nicht-methylierter DNA verwendet wird.
- 35 15. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-14, dadurch gekennzeichnet, dass als Standard mehrere Gemische aus methylierter und nicht-methylierter DNA mit unterschiedlichen Anteilen an methylierter und nicht-methylierter DNA verwendet werden.

16. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-15, dadurch gekennzeichnet, dass die Methylierungsanalyse zur Diagnose von Krebserkrankungen oder 5 anderen mit einer Veränderung des Methylierungsstatus assoziierten Krankheiten erfolgt.

17. Verfahren oder Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, dass die Methylierungsanalyse zur Vorhersage von unerwünschten Arznei- 10 mittelwirkungen und zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben, oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung erfolgt.

15 18. Ein Kit, der aus Reagenzien zur Durchführung eines WGA-Verfahrens oder aus bereits über ein WGA-Verfahren amplifizierter DNA sowie aus Reagenzien zur Durchführung einer Bisulfitumwandlung besteht, und optional auch eine Polymerase, Primer und/oder Sonden für eine Amplifikation 20 und Detektion enthält

19. Methylierte DNA, die über ein WGA-Verfahren hergestellt und anschließend mittels eines Enzyms methyliert wurde.

25 20. Methylierte DNA die über ein WGA-Verfahren hergestellt und anschließend mittels der Sss1 Methylase methyliert wurde.

30 21. Gemisch aus methylierter und nicht-methylierter, über ein genomweites Amplifikationsverfahren hergestellter DNA.

35 22. Gemisch aus methylierter und nicht-methylierter, über ein genomweites Amplifikationsverfahren hergestellter

DNA, bei dem der Anteil der methylierten DNA zwischen 5 und 95 % liegt.

5 23. Gemisch aus methylierter und nicht-methylierter, über ein genomweites Amplifikationsverfahren hergestellter DNA, bei dem der Anteil der methylierten DNA zwischen 10 und 80 % liegt.

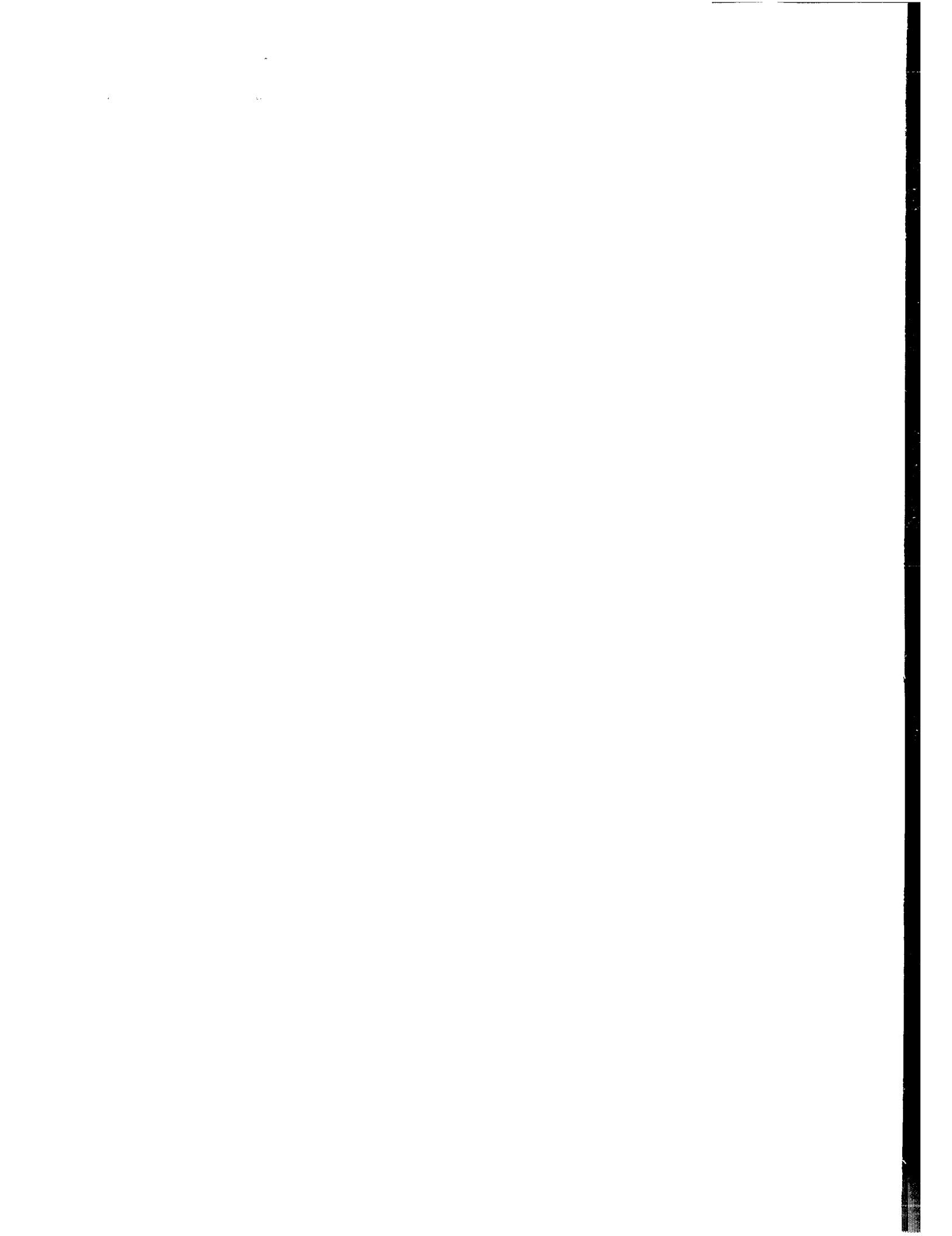
10 24. Gemisch aus methylierter und nicht-methylierter, über ein genomweites Amplifikationsverfahren hergestellter DNA, bei dem der Anteil der methylierten DNA zwischen 25 und 75 % liegt.

15 25. Verwendung der DNA nach den Ansprüchen 19 bis 20 oder eines Gemisches nach einem der Ansprüche 21 bis 24 zur Methylierungsanalyse.

EPO-BERLIN
05-02-2004

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Her-
stellung von DNA, in der 5-Methylcytosin nicht auftritt.
5 Solche nicht-methylierte DNA ist insbesondere als Kon-
trolle für eine verlässliche und sensitive Analyse von Cy-
tosinmethylierungen erforderlich. Die nicht-methylierte
DNA wird dabei über genomweite Amplifikationsverfahren,
10 insbesondere über eine „Multiple Displacement Amplifica-
tion“ (MDA) synthetisiert. Die nicht-methylierte DNA
lässt sich als Standard in einer Vielzahl von Methoden zur
Methylierungsanalyse einsetzen.



<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 5

gggggttgggtt ggtttattaga

20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 6

aaccctctac ccacctaatt

20

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 7

ggttgggttga aggaatagaa at

22

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 8

atttagtagc gacgataagt

20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 9

gtagcgacga taagtaaagt

20

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 10
tttagtagcga cgataagtaa a 21

<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 11

tttatttagt agcgacgata ag 22

<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 12

ttagtagtga tgataagtaa agt 23

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 13

ttttattnag tagtgatgtat aagt 24

<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 14

tttatttagt agtgatgtata agtaa 25

<210> 15
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 15

ttattnatgtatgtataa gtaaaa 25

<210> 16
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 16

gggatcgttt taaatcgag 19

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 17

ggatcgtttt aaatcgagtt 20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 18

tgggatcgtt ttaaatcgag 20

<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 19

gatcgtttta aatcgagttt t 21

<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 20

tgggattgtt ttaaattttag t 21

<210> 21
<211> 22

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 21

gattgttta aattgagttg tg 22

<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 22

ggattgttt aaattgagtt gt 22

<210> 23
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 23

tttgggattg ttttaattg ag 22

<210> 24
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 24

gttcgcggtt acggatta 18

<210> 25
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 25

gttcgcggtt acggattat 19

<210> 26
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 26

tgttcgcggta

19

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 27

gttcgcggtt acggattatg

20

<210> 28
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 28

gtttgtggtt atggattatg a

21

<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 29

tattttgttt gtgggttatgg a

21

<210> 30
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 30

ttgtttgtgg ttatggattat

21

<210> 31
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 31	
ttttgttgtt gtatggat ta	22
<210> 32	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)	
<400> 32	
tatcgattt cgtttttttt	19
<210> 33	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)	
<400> 33	
ttatcgattt cgtttttttt	20
<210> 34	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)	
<400> 34	
ttttatcgga ttcttttttt	20
<210> 35	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)	
<400> 35	
gttttatcggtt attcgatgtt	20
<210> 36	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)	
<400> 36	
ggttttatcg gatttgttgg t	21

<210> 37
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 37

ttttattgga tttgttagtt tt 22

<210> 38
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 38

gttttattgg atttgttagt tt 22

<210> 39
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 39

gttttattgg atttgttagt ttt 23

<210> 40
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 40

agtattttcg gacgagga 18

<210> 41
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 41

tttcggacga ggatgatt 18

<210> 42
<211> 19

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 42

tatTTTCGGA CGAGGATGA

19

<210> 43
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 43

TTAGTATTTC CGGACGAGG

19

<210> 44
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 44

AGTATTTTG GATGAGGATG A

21

<210> 45
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 45

TGTTAGTATT TTTGGATGAG G

21

<210> 46
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 46

TTTGGATGA GGATGATTAA G

21

<210> 47
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 47

gtatTTTgg atgaggatga t 21

<210> 48
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 48

gtagcgggag agcgag 16

<210> 49
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 49

agtagcggga gagcgag 17

<210> 50
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 50

tagtagcggg agagcgag 18

<210> 51
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 51

tagtgggaga gtgaggga 18

<210> 52
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 52
agttagtggga gagtgagg 18
<210> 53
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 53

gtagtagtgg gagagtgag 19
<210> 54
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 54

gtagtggag agtgagg 17
<210> 55
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 55

atagtcgtag tcggtttg 19
<210> 56
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 56

tttatagtcg tagtcggttt 20
<210> 57
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 57

ttttatagtc gtagtcggtt t 21

<210> 58
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 58

atttttatag tcgttagtcgg t 21

<210> 59
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 59

agttgttagtt ggaaaaa 19

<210> 60
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 60

aatttttata gttgttagttg gt 22

<210> 61
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 61

taatttttat agttgttagtt ggt 23

<210> 62
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 62

gtaatttta tagttgttagt tggt 24

<210> 63
<211> 22

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 63

aagtttatcg tagaggtttt at 22

<210> 64
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 64

tttaagttt atcgttagagg tt 22

<210> 65
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 65

ttaagtttat cgtagaggtt tta 23

<210> 66
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 66

aagtttatcg tagaggtttt ata 23

<210> 67
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 67

aagtttattg tagaggtttt at 22

<210> 68
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 68

ttaagtttat tgttagaggtt tt 22

<210> 69
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 69

tttaaagtttt attgttagagg tt 22

<210> 70
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 70

tttaaagtta ttgttagaggt tt 22

<210> 71
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 71

gggcgttgtt taacgta 17

<210> 72
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 72

gggcgttgtt taacgtat 18

<210> 73
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 73
gggggtgttg tttaatgtat 19
<210> 74
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 74

gggtgttgtt ttaatgtat 19
<210> 75
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 75

tgtttaacgt atcgaatagt t 21
<210> 76
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 76

tgtttaacgt atcgaatagt ta 22
<210> 77
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 77

ttgtttaacg tatcgaatag tt 22
<210> 78
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 78

ttgtttaacg tatcgaatag tta 23

<210> 79
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 79

gttgttaat gtattgaata gt 22

<210> 80
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 80

gttgttaat gtattgaata gtt 23

<210> 81
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 81

gttgttaat gtattgaata gtta 24

<210> 82
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 82

ggaggtcgat ttaggtg 17

<210> 83
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 83

ggaggtcgat ttaggtgg 18

<210> 84
<211> 18

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 84

ggaggtttagt ttaggtgg

18

<210> 85
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 85

ttacggtcgg aggtcgat

18

<210> 86
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 86

agttacggtc ggaggt

16

<210> 87
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 87

tagttacggc cgaggat

17

<210> 88
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 88

aatagttacg gtcggagg

18

<210> 89
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 89

aatagttatg gttggaggt

19

<210> 90
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 90

gaatagttat ggttggaggt

20

<210> 91
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 91

gttatggttg gaggttgat

19

<210> 92
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 92

ttatggttgg aggttgattt

20

<210> 93
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 93

gttacggtt aacggtgg

18

<210> 94
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 94
ttacggtaa cggat 18
<210> 95
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 95

aagtttacgg ttaacgg 19
<210> 96
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 96

ttaagtttac ggttaacgg 20
<210> 97
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 97

agtttatggtaatggg 20
<210> 98
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 98

agtttatggtaatggg t 21
<210> 99
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 99

ttatggtaa tggtggatta tt 22

<210> 100
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 100
gttaagttta tggtaatgg tg 22

<210> 101
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 101
ggaatgcgcg aggag 15

<210> 102
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 102
gaatgcgcga ggagaa 16

<210> 103
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 103
gaatgcgcga ggagaat 17

<210> 104
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 104
aatgcgcgag gagaataa 18

<210> 105
<211> 18

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 105

ggaatgtgtg aggagaat

<210> 106
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 106

ggaatgtgtg aggagaata

<210> 107
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 107

gaatgtgtga ggagaataaag

<210> 108
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 108

ggaatgtgtg aggagaataa

<210> 109
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 109

agagagtgcg tcggag

<210> 110
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

18

19

20

20

16

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 110

gagagtgcgtt cgaggat

16

<210> 111
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 111

agagtgcgttc ggagata

16

<210> 112
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 112

agagtgcgttc ggagtag

17

<210> 113
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 113

agagagtgtt ttggagt

17

<210> 114
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 114

agagagtgtt ttggagta

18

<210> 115
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 115
gagagtgtgt tggagtag 18

<210> 116
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 116

agagagtgtg ttggagtag 19

<210> 117
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 117

tgtcgtaag tttacggtt 19

<210> 118
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 118

gtgtcgtaa gtttacggt 19

<210> 119
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 119

agtgtcgta agtttacggt 20

<210> 120
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 120

tgtcgtaag tttacggta 20

<210> 121
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 121

agtgttgtt agtttatgg t 21

<210> 122
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 122

gagtgttgtt aagtttatgg t 21

<210> 123
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 123

gtgttgtt aa gtttatggtt 22

<210> 124
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 124

agtgttgtt agtttatgg t 22

<210> 125
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 125

ggattattcg ggtacgtg 18

<210> 126
<211> 18

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 126

tattcgggta cgtggtag 18

<210> 127
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 127

attattcggg tacgtgg 18

<210> 128
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 128

attattcggg tacgtggta 19

<210> 129
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 129

atttgggtat gtggtaggt 19

<210> 130
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 130

ttatttgggt atgtggtagg 20

<210> 131
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 131

tat~~t~~ttggta tgtggtaggt 20

<210> 132
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 132

tttaggatta tttgggtatg tg 22

<210> 133
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 133

tgtacgttcg cggattta 17

<210> 134
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 134

gtacgttcgc ggattatt 18

<210> 135
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 135

ttgtacgttc gcggattta 18

<210> 136
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 136
tgtacgttcg cgaggattat 18
<210> 137
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 137

gtttgtatgt ttgtggatta t 21
<210> 138
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 138

tgtatgttg tggattattt tt 22
<210> 139
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 139

gtatgttgtt ggattatttt tg 22
<210> 140
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 140

ttgtatgttt gtggattattt tt 22
<210> 141
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 141

ttttggacgg tatacggtta 19

<210> 142
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 142

tttggacggt atcgtttatt 20

<210> 143
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 143

tttttggacg gtagcggtta 20

<210> 144
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 144

ggacggtatac gtttattata g 21

<210> 145
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 145

tagttttgg atggatttgt t 21

<210> 146
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 146

gtttttggat ggtattgtt at 22

<210> 147
<211> 23

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 147

tggatggtat tgtttattat agg

23

<210> 148
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 148

tttggatgg tattgtttat tat

23

<210> 149
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 149

tttcgagtag gatcggg

17

<210> 150
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 150

tttcgagta ggatcggg

18

<210> 151
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 151

tttcgagtag gatcggga

18

<210> 152
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 152

tttcgagtag gatcgggat

19

<210> 153
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 153

gtttttagtta ggattggga

19

<210> 154
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 154

tttttagtta gattgggat

19

<210> 155
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 155

tttttagtta gattgggatt

20

<210> 156
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 156

tttttagtta ggattgggat

20

<210> 157
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 157
gaagagcgga tagcgat 17
<210> 158
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 158

aagagcggtt agcgattt 18
<210> 159
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 159

agagcggata gcgatttt 18
<210> 160
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 160

gagcggatag cgattttt 19
<210> 161
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 161

aggaagagtg gatagtgat 19
<210> 162
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 162

ataggaagag tggatagtga t 21

<210> 163
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 163

agagtggata gtgattttta a 21

<210> 164
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 164

gaagagtgga tagtgatttt ta 22

<210> 165
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 165

aaatgtcggt cgtggtag 18

<210> 166
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 166

aaaatgtcggt tcgtggtag 19

<210> 167
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 167

gtaaaaatgt cgttcgtgg 19

<210> 168
<211> 20

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 168

ttaaaaatgtc gttcgtggta

20

<210> 169
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 169

aatgttgttt gtggtaggg

19

<210> 170
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 170

aaaatgttgt ttgtggtagg

20

<210> 171
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 171

aaaaatgttg tttgtggtag g

21

<210> 172
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 172

gttaaaaatgt tgtttgtggta

21

<210> 173
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 173

ttttaacgcg taagcgta

18

<210> 174
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 174

ttaacgcgta agcgtatata

19

<210> 175
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 175

tttaacgcgt aagcgatata

19

<210> 176
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 176

taacgcgtaa gcgtatattt

20

<210> 177
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 177

gatttttaat gtgttaagtgt ata

23

<210> 178
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 178

ttaatgtgta agtgtatatt ttt

23

<210> 179

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 179

gatttttaat gtgttaatgtt atat

24

<210> 180

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 180

gatttttaat gtgttaatgtt atatt

25

<210> 181

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 181

gaacgtgagt acgaggt

17

<210> 182

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 182

gaacgtgagt acgaggta

18

<210> 183

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 183

aagaacgtgta gtacgagg

18

<210> 184
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 184

gaagaacgtg agtacgag 18

<210> 185
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 185

ggaagaatgt gagtatgagg 20

<210> 186
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 186

aggaagaatg tgagtatgag 20

<210> 187
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 187

gaagaatgtg agtatgaggt a 21

<210> 188
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 188

gaatgtgaggt atgaggtatt g 21

<210> 189
<211> 17

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 189

gattcggtgc ggtaga

<210> 190
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 190

gattcggtgc ggtagag

<210> 191
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 191

attcggtgcg gttagaga

<210> 192
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 192

ggattcggtg cggttaga

<210> 193
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 193

ggatttgggtg tggtagaga

<210> 194
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

17

18

18

18

20

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 194

atttgttg gttagagaat t

21

<210> 195
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 195

gatttgttgt gtttagagaa t

21

<210> 196
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 196

atttgttg gttagagaat tt

22

<210> 197
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 197

ggtgcgcgta gagaat

16

<210> 198
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 198

ttggtgcgcg tagaga

16

<210> 199
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 199
tggtgcgcgta agagaa 16
<210> 200
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 200

ggtgcgcgta gagaata 17
<210> 201
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 201

aggtttggtg tgttaga 18
<210> 202
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 202

tggtgtgtgt agagaataa 19
<210> 203
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 203

tttggtgtgtgt gtagagaata 20
<210> 204
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 204

tttggtgtgtgt gtagagaata a 21

<210> 205
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 205

ggatatcggt tcggagtt 18

<210> 206
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 206

agaggatatac ggttcgga 18

<210> 207
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 207

gatatcggtt cgagtttag 19

<210> 208
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 208

tatcggttcg gagtttagat 19

<210> 209
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 209

gtagaggata ttgggtttgga 20

<210> 210
<211> 20

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 210

gaggatattg gtttggagtt 20

<210> 211
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 211

atattggttt ggagtttagat ta 22

<210> 212
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 212

gatattggtt tggagttaga tta 23

<210> 213
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 213

atatcgaacg ggatttagag 20

<210> 214
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 214

ttttttaat atcgaacggg a 21

<210> 215
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 215

ttaaatatcg aacgggattt ag

22

<210> 216
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 216

tttaaatatc gaacgggattt ta

22

<210> 217
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 217

atattgaatg ggatttagag tt

22

<210> 218
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 218

taaatattga atgggattta gag

23

<210> 219
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 219

ttaaatattg aatgggattt agag

24

<210> 220
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 220
ttttttaaa tattgaatgg gatt 24
<210> 221
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 221

gggagttcgc gggat 15
<210> 222
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 222

ggagttcgcg ggattt 16
<210> 223
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 223

gagttcgcgg gattttt 17
<210> 224
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 224

gagttcgcgg gatttttt 18
<210> 225
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 225

gggagtttgt gggattt 17

<210> 226
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 226

gggagtttgt gggatttt 18

<210> 227
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 227

ggagtttgtg ggatttttt 19

<210> 228
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 228

ggagtttgtg ggattttttta 20

<210> 229
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 229

gagtttcgtc gtcgtagtt 19

<210> 230
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 230

tggagtttgtt ttgttgttag 19

<210> 231
<211> 21

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 231

ttggagtttt gttgtttag t

21

<210> 232
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 232

ggtttttcgt ttatttcgag

20

<210> 233
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 233

gtttttcgtt tatttcgaga t

21

<210> 234
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 234

aggtttttcg tttatttcga g

21

<210> 235
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 235

gtttttcgtt tatttcgaga tt

22

<210> 236
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 236

ggtttttgt ttattttag a

21

<210> 237
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 237

ggtttttgt ttattttag at

22

<210> 238
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 238

aggtttttg tttattttga ga

22

<210> 239
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 239

gtagggtttt tgtttatttt gag

23

<210> 240
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 240

attcgggacg ggggt

15

<210> 241
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 241
gattcgggac ggggg 15

<210> 242
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 242

agattcggga cgggg 15

<210> 243
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 243

gagattcggg acggg 15

<210> 244
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 244

gatttggat ggggtt 17

<210> 245
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 245

agatttggga tgggggt 17

<210> 246
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 246

gagatttggg atgggggg 17

<210> 247
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 247

gatttggat gggggttt 18

<210> 248
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 248

atgttatttt cgcggggt 18

<210> 249
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 249

atgttatttt tgtggggtt 19

<210> 250
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 250

gatgttattt ttgtggggtt 20

<210> 251
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 251

tttcgcgag gtgttta 17

<210> 252
<211> 18

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 252

ttttcgcgag gtgttat 18

<210> 253
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 253

tttttcgcga ggtgttta 18

<210> 254
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 254

tttttcgcga ggtgttat 19

<210> 255
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 255

gttttttgta aggtgttat 20

<210> 256
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 256

ttttttgtga ggtgttat t 21

<210> 257
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 257

gttttttgtg aggtgtttat t

21

<210> 258
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 258

gttttttgtg aggtgtttat tt

22

<210> 259
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 259

aaacgaggga gcgttag

17

<210> 260
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 260

aaaacgaggg agcgtta

17

<210> 261
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 261

taaaaacgagg gagcggtt

17

<210> 262
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 262
taaaaacgagg gagcgtta 18

<210> 263
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 263
aatgaggga gtgttagg 18

<210> 264
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 264
aatgaggga gtgttagga 19

<210> 265
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 265
aaaatgaggg agtgttagg 19

<210> 266
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 266
tgtaaaatga gggagtgtt 19

<210> 267
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 267
ggtcgttagt tttcgtgt 20

<210> 268
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 268

ggttgttagt tttttgtgta 20

<210> 269
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 269

ggttgttagt tttttgtgta a 21

<210> 270
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 270

tggttgttag ttttttgt a 21

<210> 271
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 271

ggttgttagt tttttgtgta at 22

<210> 272
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 272

cccaactaaac atacccttat tc 22

<210> 273
<211> 19

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 273

atttgggaaa gagggaaag 19

<210> 274
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 274

taaaaaactct aaaccccatc c 21

<210> 275
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 275

agtaaaatagt gggtgagtta tgaa 24

<210> 276
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 276

aaaaaacctc taaaaactac tctcc 25

<210> 277
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 277

taaggggaga ggaggagttt 20

<210> 278
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 278

accaattctc aatcatatct tt

22

<210> 279

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 279

aaggttttag ggaagagtgt tt

22

<210> 280

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chemically treated genomic DNA (Homo sapiens)

<400> 280

accttttctt atcacaaaaaa taa

23

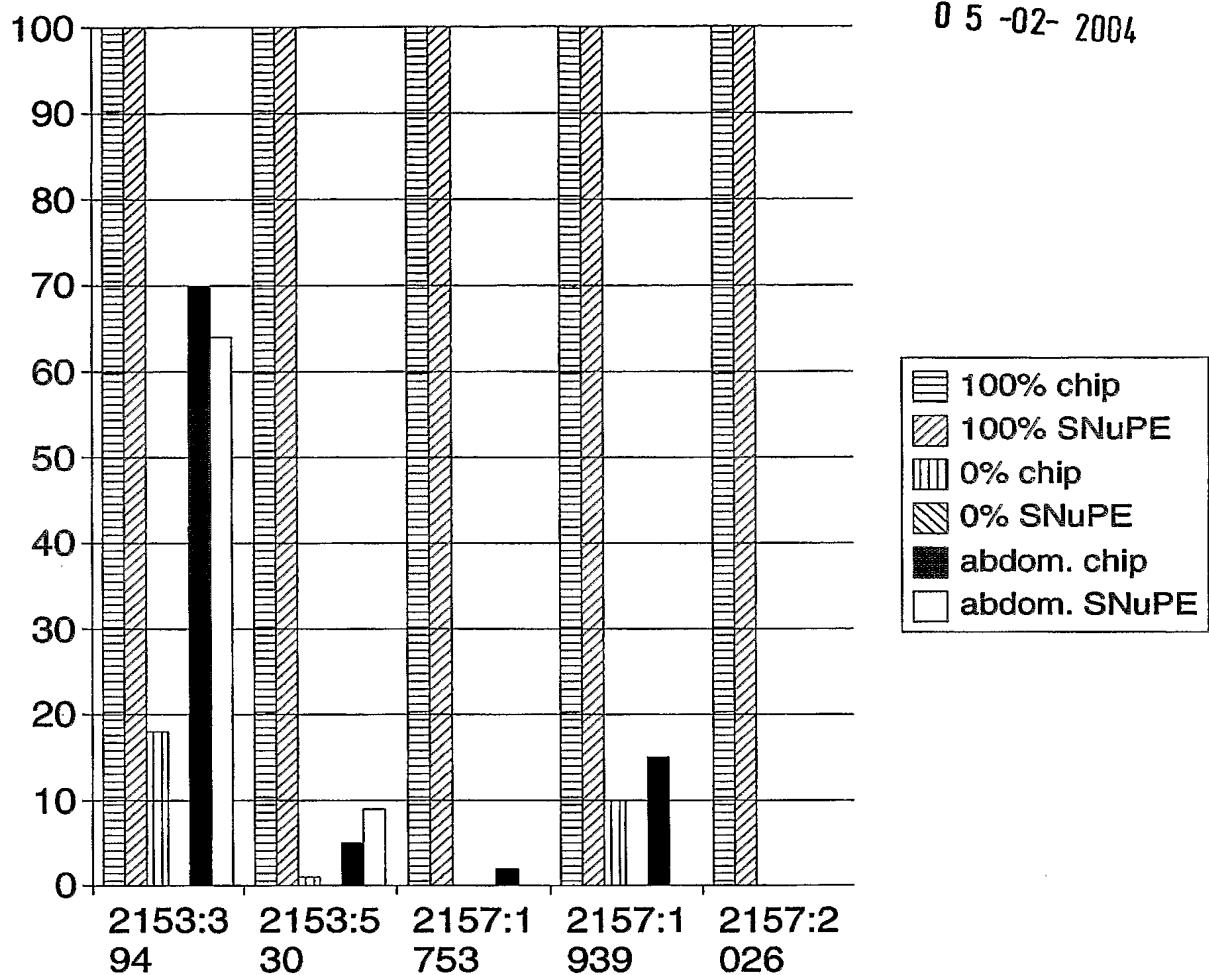


Abb. 1

